动 物 学 研 究 2001, Oct. 22 (5): 413～420
Zoological Research

CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853

综 述

家猫及其他猫科动物的生殖工程研究

李光鹏 廉 莉 廉 颖 陈大元[①]
（中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080）

摘要：在脊椎动物中，猫科动物是一类比较特殊的动物类群，共有37种动物。除家猫外，其余均为珍稀或临近灭绝的濒危动物。因而了解家猫的生殖习性和生殖规律，尤其是了解家猫胚胎工程领域，如猫卵母细胞的体外成熟（*in vitro* maturation，IVM）、体外受精（*in vitro* fertilization，IVF）、显微受精等，对于利用现代生殖技术研究和探讨非家猫猫科动物的繁殖和保护具有极为重要的借鉴意义。

关键词：生殖工程；体外成熟；体外受精；显微受精
中图分类号：Q959.838，Q813.7，Q492 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2001)05－0413－08

1 家猫胚胎的体内发育

要确切地判断体外发育的家猫胚胎是否正常，必须对体内自然情况下的猫胚胎发育有一个全面的了解。Swanson *et al*.(1994)对平均年龄为20个月的成年母猫的体内发育作了研究。实验猫在控光条件下(12L:12D)饲养。出现明显发情行为的第2天开始交配，连续交配2 d，每天交配3次，间隔3 h。排卵一般发生在第1次交配后的48～64 h。第1次交配后64 h有65%的胚胎完成第1次卵裂；76 h有64.3%的胚胎发育到5～8细胞；100 h有58.3%发育到9～16细胞；124 h有71.4%发育到桑葚胚和致密桑葚胚；148 h有61.1%的胚胎发育为致密桑葚胚，22.2%为囊胚。在交配后64～124 h期间，所有胚胎均位于输卵管中，即从受精卵到桑葚胚的胚胎位于输卵管中；而148 h时，胚胎均位于子宫。说明猫胚胎是在致密桑葚胚期由输卵管向子宫迁移的。同猪(Dziuk，1985)和狗(Shimizu *et al*.，1990)一样，猫胚胎在两侧子宫中具有迁移能力，可以从一侧迁移到另一侧，以进行合理分布和着床。

2 家猫及其他猫科动物的超数排卵

卵泡发育可被外源促性腺激素如卵泡刺激素(FSH)、马绒毛膜促性腺激素(eCG)、孕马血清促性腺激素(PMSG)等诱导，而且可用GnRH或hCG诱导排卵(Phillips *et al*.，1982；Goodrowe & Wildt，1987)。对家猫的超排目前多采用PMSG/hCG、FSH/hCG或eCG/hCG 3种处理方式。PMSG/hCG法即每只母猫肌肉注射100 IU PMSG，84 h后注射100 IU hCG；FSH/hCG法即连续4 d分8次递减肌注总量为1.0～1.5 mg的FSH，在第1次注射FSH 84 h后注射100 IU hCG；eCG/hCG法即肌肉注射150 IU eCG，84 h后注射100 IU hCG。3种处理方式在不同作者中有不同的反映，如有人认为PMSG/hCG处理效果不及FSH/hCG和eCG/hCG(Wildt *et al*.，1978；吕连升等，1990)。目前普遍使用的是eCG/hCG和FSH/hCG超排方式，在注射hCG后25～27 h利用腹腔镜自卵巢卵泡中在体抽取卵母细胞，或注射hCG后34～38 h自输卵管冲得卵母细胞。

我们在实验中也用FSH对家猫进行超排。方法如下：前2次每次注射0.30 mg FSH，后6次每次注射0.15 mg FSH，待12 h后注射100 IU hCG，并立即用一玻璃棒刺激动物阴道。注射hCG后34～38 h自输卵管冲得卵母细胞，每只家猫平均超排卵数9.15枚（李光鹏等，2001）。

收稿日期：2001－01－15；修改稿收到日期：2001－07－05
基金项目：中国科学院知识创新工程重大项目（KSCIX－05－01）和科技部攀登计划专项（95－专－08）资助项目
①通讯作者

由于FSH需要进行多次注射，易引起动物尤其是非家猫猫科动物的精神紧张，有时会出现不良应激反应，影响超排效果。所以在非家猫猫科动物中一般采用eCG/hCG进行超排。用eCG/hCG处理对虎的超排效果至少与对家猫、猎猫和美洲狮一样，甚至更好；而多次的FSH注射对虎的效果较差(Phillips *et al*.,1982)，尽管FSH对猎豹、狮子、豹、美洲狮和印度沙漠猫是有效果的(Phillips *et al*., 1982;Wildt *et al*.,1986;Pope *et al*.,1989)；而且多次注射eCG/hCG，猎猫还会产生免疫抗性。

家猫是诱导性排卵动物，刺激卵泡发育的促性腺激素处理与排卵激素处理之间的时间间隔也是影响家猫排卵的重要因素。在以前的研究中，在注射eCG后72 h或80 h再注射hCG，结果80 h卵的体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)率为45.2%，而72 h的为34.6%，二者有显著差异。这种差异可能是eCG与hCG注射的时间间隔不够而导致卵母细胞最终发育不足，或是由于干扰了内源内分泌环境间接所致。FSH样(FSH-like)与LH样(LH-like)刺激间隔影响卵的完整性和受精能力，如仓鼠(Mizoguchi & Dukelow, 1980; Sengoku & Dukelow, 1988)、小鼠(Hillier *et al*., 1985; Edgar *et al*., 1987)、猴(Williams & Hodgen, 1980)和人(Levran *et al*., 1985;Templeton *et al*.,1986)。

Donoghue *et al*.(1992)分别在eCG注射80、84、88、92和96 h后再注射hCG，在hCG注射后25~27 h自卵泡中抽取卵进行IVF。结果表明80~92 h组间卵的数量(17.2~21.1)无差异，但高于96 h组(10.3)；80~88 h组的卵比92或96 h组的质量要好，96 h组的卵有25%退化；IVF率在80(57.1%)、84(56.5%)、88(65.0%)和92(52.5%) h组的高于96(33.6%) h组；80~84 h组可产生较其他组更高的17-β雌二醇。

Adams(1982)报道猫排卵不是随机的，而往往发生在交配或类似交配行为的刺激之后24~30 h。Donoghue*et al*.(1993)分别对36只猫在自然发情的第1天、第2天或第3天注射100 IU hCG，24~26 h后腹腔镜检查卵泡，收集卵泡卵，并进行受精。结果在自然发情组发情第1天的猫产生的卵泡少，而且有88.9%的卵退化或未成熟，不适于IVF。尽管PMSG/hCG组只有54.4%的猫表现出明显的发情，但产生的卵泡量(9.7±0.8)和收集到的卵数(8.7±0.8)至少是自然发情组的2倍，即超排组每个供体至少产生多于自然组2倍的胚胎数。而且还发现，发情第1天不适于LH刺激，PMSG/hCG组的胚胎质量亦未受激素处理的影响。

同其他哺乳动物一样，对猫进行反复超排后，卵巢对刺激的响应显著下降，而且产生免疫抗性。Swanson *et al*.(1995)报道，反复的eCG/hCG注射，可能引起母猫免疫抑制，影响超排效果。用ELISA检查公猫、处女猫和eCG/hCG刺激过的母猫是否有免疫球蛋白与eCG、hCG和猪FSH(pFSH)结合。结果发现，多次接受eCG/hCG处理的猫在停止注射44~50 d后，其血清中与eCG和hCG结合的免疫球蛋白量显著高于公猫、处女猫或只超排1次的猫，表明家猫对eCG/hCG处理产生严重的免疫拮抗。

3 人工授精

1992年Howard *et al*. 利用eCG和hCG对家猫进行超排处理后，进行腹腔镜人工授精(artificial insemination, AI)。在此之后，在其他几种猫科动物中进行了同样的工作，以期利用辅助生殖手段来保护和扩大濒危动物种群。这些尝试使猎豹(*Acinonyx jubatus*)(Howard *et al*.,1996b)、云豹(*Neofelis nebulosa*)(Howard *et al*.,1996a)、西伯利亚虎(*Panthera tigris altaicia*)(Donoghue *et al*.,1993)、美洲狮(*Felis concolor*)(Barone *et al*.,1994)、雪豹(*Panthera uncia*)(Roth *et al*.,1997)等产仔成功。AI技术在猎豹和家猫中尤为成功，经腹腔镜AI后妊娠率可达50%(Howard *et al*.,1992,1993)。

以猫为例概述腹腔镜AI操作过程如下：每日观察猫的发情情况，对连续3 d以上没有发情表现的母猫，肌注100 IU eCG，80 h后肌注75 IU hCG，36~38 h后实施AI；用ketamine hydrochloride(10.0 mg/kg)+arepromazine maleate(0.2 mg/kg)麻醉猫，将7 mm的腹腔镜自腹部插入约4 cm，探测卵巢是否有新排卵点(fresh corpora lutea, CL)；如已经排卵，则用内置导管(indwelling catheter)自皮下直接插入子宫角的头端，将精液(每个子宫角100 μL)注入子宫腔中。输精前需检查精子的数量及活力(Roth *et al*., 1997)，精子浓度应达到2~3×10^5/mL。

虽然AI方法在猫及猫科动物中证明是可行的，但是还存在一些问题。如通过腹腔镜进行的AI得到的幼仔要比正常繁殖的幼仔小一些，采用IVF/ET技术也有类似的结果。出现前一问题的原因可能是猫处于麻醉状态，在检查排卵情况时，尤其是在排卵

敏感期内，由于触及输卵管伞，很容易造成卵的丢失；或是猫排卵过程的不同步，在AI时还有一些卵泡未排放。受这些因素的干扰，导致受孕率及手术的成功率降低。AI手术也会影响大鼠（Vanderhden *et al*.，1986）和羊（Robinson *et al*.，1989）胚胎的质量。

4 卵母细胞的体外成熟（IVM）、体外受精（IVF）和体外培养（IVC）

4.1 卵泡卵母细胞的收集

猫的卵母细胞来源一般有2类。一类来自实验室。通常采用超排方法在注射hCG 25～27 h后，借助腹腔镜自卵巢表面抽取≥2 mm的卵泡卵。其操作方法为，将实验猫麻醉，将一4 cm长的针自腹部正中插入腹腔，在腹腔镜的引导下，找到一侧卵巢，吸取表面的卵泡，将内容物全部吸出，根据卵的形态及其周围的卵丘细胞情况评价卵的质量及其成熟状态。如卵的放射冠及卵丘细胞已经松散并且扩展开，则认为卵已经成熟。如果卵外有紧密的放射冠、卵丘细胞仍然很致密，则是不成熟的，需经过体外成熟培养才能进行受精（Donoghue *et al*.，1992）。

卵母细胞的另一类来源是当地宠物诊所。将因作绝育手术或因病作卵巢切除手术所得的卵巢放入含100 IU/mL青霉素钠和0.1 mg/mL链霉素的15mL PBS液中直接送回实验室（4℃可保存24 h），从卵巢表面抽出卵泡，进行体外成熟培养（Johnston *et al*.，1989；Wolfe & Woldt，1996；Hoffert *et al*.，1997）。

4.2 IVM

成熟培养液为EMEM，即含Earle's盐的MEM和碳酸氢盐缓冲液，2.0 mmol/L谷氨酰胺，0.1 mmol/L丙酮酸，0.4% BSA，100 IU/mL青霉素，0.1 mg/mL链霉素，0.2 mg/mL新霉素，1 μg/mL FSH，2 μg/mL LH，1 μg/mL 17-β雌二醇（Hoffert *et al*.，1997）。50～100 μL液滴中含15～20枚卵，在38℃、5% CO_2中培养27～29 h（Wolfe & Woldt，1996）。培养液中BSA的存在似乎比FCS的存在更有利于卵的成熟；然而当FSH＋LH＋17-β雌二醇存在时，FCS的加入可提高IVF率和卵裂率。FCS可以通过抑制透明带硬化而提高IVF。Schramm & Bavister（1995）认为促性腺激素和催乳激素对猫卵母细胞的核质成熟具有显著促进作用。

我们用TCM－199＋10%FCS和TCM－199＋10%FCS＋PMSG 2种培养液对猫卵巢卵母细胞进行培养，发现其成熟（排放第1极体）率分别为48.8%（66/135）和78.9%（116/147）（李光鹏等，2001），说明PMSG对猫卵的体外成熟有促进作用。

4.3 IVF

IVF前先进行精子的处理。通过电刺激或假阴道（Wildt *et al*.，1983）收集精液，把采得的精液放到1.5 mL锥形管中，用同样体积的mKRB（Toyoda & Chang培养液）进行稀释，再离心（300 *g*）8 min；弃去上清液，将150 μL mKRB缓冲液加到沉淀物中，室温下精子上浮1 h。对上浮的精液进行精子浓度分析及精子运动活力鉴定。精子质量一般分为0～5级（Donoghue *et al*.，1992；Wildt *et al*.，1983）：0级为精子不动，5级为精子快速、直线向前运动。只有含75%的运动精子，3级以上的精液才用于IVF。受精时活动精子最终浓度为2×10^5/mL（Donoghue *et al*.，1992）。

将10枚成熟的卵母细胞放入100 μL精子悬液中，在37℃、5% CO_2、95%空气中进行培养，精卵比为10卵/2×10^4运动的精子。培养12～18 h后，将卵母细胞移出并用0.2%透明质酸洗涤，以去除卵丘细胞及粘附的精子。然后再把卵母细胞放到100 μL新鲜培养液中继续培养12～18 h，根据卵裂到2细胞的情况判定受精率（Donoghue *et al*.，1992）。

精卵共同培养后，从15 min到5 h，精子穿卵率从0上升至100%。受精后3～4 h，精子头部发生去致密化，形成雌雄原核（Niwa *et al*.，1985；Pope *et al*.，1993）；而Goodrowe *et al*.（1988）认为受精后24 h才有原核形成。两者之间的差异可能是卵的成熟程度及所用精子的活性不同所致。Pope *et al*.（1993）对处于发情间期的猫进行超排处理，在hCG注射后25～27 h取卵泡卵于受精液（精子浓度1～2 $\times10^5$/mL）中38℃、5% CO_2条件下培养4～6 h。为确定精子穿卵时间及其受精事件，在共培养0.5～10 h期间进行压片处理。结果发现在0.5～3 h期间的精子穿入率为95%，在共培养2 h、6～8 h和10 h分别发生第2极体排放、原核形成和雌雄原核相遇。

4.4 影响IVM、IVF、IVC的因素

在简单培养液（Tyrode's）和复杂培养液（HF－10、TCM－199、CMRL－1066）中均可以对IVF的受精卵进行培养，但不同的培养液及其不同来源的蛋

白质对IVF及其胚胎发育有不同的影响。mKRB、TALP、Ham's F10+BSA的IVF率分别为75.0%、70.6%、80.0%。在Ham's F10中分别加入PVA、BSA、FCS、ECS后，IVF率分别为67.3%、80.0%、84.0%、85.2%。FCS或ECS的培养效果优于PVA。用Ham's F10、TALP和mKRB培养，加入BSA后分别有95.0%、77.8%和88.9%的卵发育到桑葚胚期。在加入PVA、BSA、FCS、ECS后的桑葚胚发育率是一致的，但囊胚发育率则不一致。在加入ECS和FCS后，分别有30.8%和22.2%的卵发育到早期囊胚期；而在加入PVA和BSA后，囊胚发育率分别只有10.3%和13.8%。因而在猫IVF系统中，培养液类型和蛋白质类型对胚胎发育的影响大于对IVF的影响。培养液中血清的加入可部分地克服胚胎体外发育阻断（Johnston *et al*.，1991a，b）。

Schramm & Bavister（1995）发现FSH、LH、生长激素或催乳素对猫卵的IVF及其发育潜力无影响。Wood *et al*.（1995）认为：①蛋白质的参与对IVM和IVF并非必需；②存在FCS时培养24 h或52 h，卵母细胞的核被抑制在GV期；③外源激素促进IVM和IVF，促性腺激素和17-β雌二醇是有意义的，但孕酮的作用不明显，在激素不存在时，卵仍可以相对高的比率进行IVM、IVF和卵裂；④IVM 52 h再进行IVF，受精率降低，而体内成熟卵的IVF为60%～80%（Donoghue *et al*.，1992；Johnston *et al*.，1991c）。FCS对猫卵成熟有显著的抑制作用，这一点与其他动物不一致（Schroeder & Eppig，1984；Leibfried-Rutledge *et al*.，1987；Vanderhden *et al*.，1986）。MEN+FCS组只使9.6%的卵成熟，而在BSA组为46.7%。Vanderhden & Armstrong（1989）报道大鼠、山羊、猪、人的FCS对大鼠卵母细胞的IVM有显著抑制作用。尽管血清因子可以刺激卵母细胞的IVM，但在猫中，FCS可能含有抑制卵成熟的成分。生殖激素，尤其是甾类激素对卵母细胞IVM的作用是有争议的。猫的情况基本同大鼠、绵羊、小鼠和牛一样（Wood *et al*.，1995），外源激素可以促进卵母细胞IVM。FSH通过调节cAMP浓度而促进卵的成熟（Salustri *et al*.，1995），并促进卵丘细胞扩展。雌二醇在培养前24 h起到与促性腺激素相同的作用。Batten *et al*.（1989）认为孕酮与cAMP协同作用抑制GVBD，在小鼠中与胞质成熟无关。

IVF胚胎发育历程基本上同体内发育的情况（Swanson *et al*.，1994；Roth *et al*.，1994）。IVF率为70%～80%，而且80%以上的胚胎可以发育到桑葚胚期。发育到桑葚胚的比率，在体内来源的胚胎和IVF胚胎是一致的（Roth *et al*.，1994）。IVF后30 h，有58.7%的受精卵发育到2～4细胞期。之后，每经过24 h，基本上卵裂1次，到102 h有56.5%发育到桑葚胚。然而，IVF胚胎只有10%～30%的桑葚胚能够发育到囊胚，大部分停止于桑葚胚期（Johnston *et al*.，1991a，b；Byers *et al*.，1994）。很显然，存在着从桑葚胚到囊胚期的体外发育阻断（*in vitro* developmental block）现象。

卵母细胞的胞质内精子注射（intracytoplasmic sperm injection，ICSI）已经成为人类治疗男性寡精或无精症的有效手段。由于濒危动物的繁殖能力大大下降，存在严重的雄性不育症，因此ICSI技术在提高濒危动物繁殖能力方面可能具有现实意义。Pope *et al*.（1998）对家猫作了ICSI尝试并同时进行常规IVF对照。用150 IU eCG，或总10～15 IU FSH分4 d注射；第5天注射100 IU hCG，24～26 h后抽取卵泡卵母细胞；脱除卵丘细胞后进行ICSI。结果IVF和ICSI的受精率分别为67.9%和58.1%。培养7 d有46.7%的IVF胚胎发育到桑葚胚，53.3%发育到囊胚，桑葚胚和囊胚的发育率达100%。而只有93.7%的ICSI胚胎发育到桑葚胚（50.8%）和囊胚（42.9%）。将ICSI后得到的桑葚胚移植到4只受体猫，每只移植10～11枚，其中2只分别在妊娠66和67 d产下共3只仔猫。

5 体外发育阻断

同其他动物相似，猫IVF胚胎体外培养时也存在体外发育阻断现象。但与其他动物又有根本的不同，牛、绵羊、猪、鼠类胚胎的发育阻断发生在发育的更早期，如牛在8～16细胞期，猪在4～8细胞期，小鼠在2细胞早期。而猫胚胎的发育阻断则发生在从桑葚胚向囊胚发育的阶段。特别值得注意的是，其他动物的胚胎发育阻断可以通过改善培养液条件、改善培养环境或与体细胞共同培养的手段予以克服（Camous *et al*.，1984；Gandolfi & Moor，1987；Eyeston & First，1989）。如兔的体外发育虽然不能超过桑葚胚期，但只需在培养液中加入几种氨基酸就足以克服其阻断（严云勤等，1995）。然而，上述措施却不能有效地克服猫胚胎的体外发育阻断。

一般认为，发育阻断与胚胎发育过程中母体合子转变期（maternal zygote transion，MZT）有关。

在小鼠，MZT发生在2细胞早期，羊和牛在8~16细胞期，与其发育阻断相吻合。可能是体外培养条件影响了MZT期间的能量代谢，进而引起阻断（严云勤等，1995）。改变这些成分或因素，就可以满足MZT的代谢需要，也就可以克服阻断。那么，猫胚胎是否也存在MZT？MZT是否与阻断有关呢？Hoffert *et al*.（1997）的研究表明，猫IVF胚胎也存在MZT，MZT发生于5~8细胞期，而且发现MZT与桑-囊阻断无直接关系。他们将IVF 12 h的胚胎培养于含α-鹅膏蕈碱的培养液中，61.5%的胚胎可发育到5~8细胞期，但只有7.7%发育到9~16细胞阶段。而没有α-鹅膏蕈碱的对照组有38.0%发育到9~16细胞期。这表明胚胎的转录发生于5~8细胞期。

为了深入研究猫IVF胚胎体外发育阻断的原因，Roth *et al*.（1994）对体内和体外来源的猫胚胎进行了比较研究。分别在第1次交配后64、76、100、124和148 h收集处于1~2、5~8、9~16细胞以及桑葚胚和致密桑葚胚的胚胎，然后进行体外培养。结果表明，从发育速度看，体内、体外胚胎的发育速度是一致的。从1细胞发育到5~8细胞时速度较快，之后每经过24 h就卵裂1次，而且体内与体外桑葚胚的形成率是一致的（>60%）。然而只有体内来源的胚胎能够发生致密化，而IVF胚胎则不能。体外胚胎无一发育到囊胚阶段，而体内胚胎有70%发育到囊胚期（培养条件：100 μL新配制的HF10+0.011 mg/mL丙酮酸，0.284 mg/mL谷氨酰胺+5%FCS）。同时也发现，自体内收集胚胎的时间影响胚胎的体外发育。从1~2细胞开始培养时，只有54%的胚胎发育到桑葚胚；5~8细胞，有85.0%发育到桑葚胚；9~16细胞，则有92.0%发育到桑葚胚。同样地，发育到囊胚的比率也随着胚胎在体外培养时间的延长而下降，从1~8细胞开始培养时，只有33.3%~66.7%的胚胎发育到囊胚；而从9~16细胞开始培养，有92.0%的胚胎发育到囊胚。收集胚胎时胚胎所处的时期也影响囊胚的孵化率。当收集的胚胎处于1~2细胞期时无一能够孵化，而处于9~16细胞的胚胎有90%可以孵化。而且囊胚的孵化形式也因在体外培养时间的长短而有差异。从桑葚胚期开始培养时，表现为典型的囊胚扩展，ZP逐渐变薄，然后在整个一个极ZP溶解，扩展囊胚孵出。而当从5~8细胞期开始培养发育到囊胚后，孵化只是表现为一种ZP逃逸过程，即ZP上只出现1个小的裂缝，一部分滋养层细胞自裂缝突出，虽然有51.4%的囊胚发生孵化现象，但最终只有8.9%能够自ZP中完全孵出。

上述现象表明，即使体内来源的胚胎，随着在体外培养时间的延长，胚胎发育进展变缓，胚胎质量呈下降的趋势。体内来源的桑葚胚在体外培养时，能发生明显的致密化现象；而IVF的桑葚胚却仍保持清晰的球形卵裂球状态，不能发生致密化。致密化是囊胚形成的前提条件，不发生致密化就不能产生囊胚，这是猫IVF胚胎的一个明显缺陷。这些缺陷的造成是多方面的，可能来自体外环境的不足，也可能来自猫胚胎对体外环境的敏感性。

桑葚胚向囊胚的转变在体内正处于从输卵管向子宫的迁移过程中（Swanson *et al*.，1994），体外的培养环境尚无法达到体内这一转变过程中所具备的因素。因而可以认为，猫胚胎体外发育过程远比其他动物复杂。体外发育阻断的克服，可能需要更加完善的体内环境条件的模拟，或许进行阶段性培养条件的改善，可以揭开这个谜。

Kanda *et al*.（1998）研究了蛋白质组分和培养皿种类对猫IVF胚胎发育的影响。以Earle's平衡盐液（MK-1）为基础培养液，分别加入10%的人血清（HS）、10% FCS或0.4% BSA，IVF率分别为94.7%、56.1%和74.4%。加HS组的IVF率显著高于FCS或BSA组。当用TCM-199+10%FCS进行培养时，IVF率只有51.4%。培养于MK-HS中时，IVF胚胎的囊胚发育率为50.0%；其他各组只有4.3~17.2%。研究还发现培养皿的类型也影响发育率。分别选用组织培养皿（tissue culture dish，TCD）和病毒悬浮培养皿（suspension culture dish，SCD）进行培养，并与不同培养液组合培养。结果在MK-1+HS/SCD中培养120和144 h时，囊胚率分别为47.2%和71.7%，显著高于MK-1+BSA/SCD（11.4%和27.3%）或MK-1+BSA/TCD（10.4%和25.0%）。将MK-1+BSA/SCD培养的晚桑葚胚期胚胎移植到同期发情受体后，7只中有5只怀孕（71.4%）。将经MK-1+HS/SCD培养的早期囊胚移入受体后，10只受体中有8只怀孕（80.0%）。这些结果表明，MK-1+HS对猫胚胎克服阻断发育到囊胚是最有效的，大大提高了IVF/ET的成功率。

6 胚胎移植

最早进行食肉动物胚胎移植的是美籍华人张明

觉(Chang,1969)。他于1969年将白鼬的桑葚胚和囊胚移入受体后,获得1头仔兽(Chang,1969)。Kraemer *et al*.(1994)首次进行家猫胚胎移植,利用自然发情并交配得到的胚胎移植到自然发情的同期受体后,产下3只小猫。Kraemer *et al*.(1994)还将37枚狗胚胎移植到7只受体内,3只妊娠产下3头小狗。说明这些动物自然交配的胚胎进行移植是可行的。为得到更多的胚胎,Goodrowe & Wildt(1987)采用促性腺激素超排技术,将收集到的胚胎移入同期发情受体猫后获得幼猫。

将IVF胚胎在HF-10培养96或120 h后移植到同期发情受体,产仔率分别为31%和25%;而在TCM199或Tyrode's液中培养120 h移植后的产仔率为55%(Johnston *et al*.,1991a)。而且发现移入每只受体的胚胎数也影响妊娠率,移入≥12枚胚胎时的妊娠率要高于移植数少于12枚的。Pope *et al*.(1997)将5或6 d的桑葚胚和囊胚移入发情4或5 d的受体中,获得幼仔。

7 非家猫猫科动物的生殖工程研究

自从1980年得到首例IVF家猫后,对家猫生殖的人工辅助技术的研究相当深入。这些进展足以让人对非家猫猫科动物进行类似的人工辅助生殖,以促进其繁殖,扩大其种群数量,并保护其遗传多样性。AI和IVF/ET技术的应用,结合配子和胚胎冷冻技术的应用,将对这些濒危动物的保护具有更为现实的意义。

用于家猫的IVM-IVF-ET技术也同样适合于其他猫科动物。Donoghue *et al*.(1990)分别用2 500和5 000 IU的eCG对虎进行超排,84 h后注射2 000 IU的hCG,24~26 h后利用腹腔镜取卵。从卵泡(≥2 mm)发育情况来看,所有雌虎对外源激素均有反应,卵泡数为每头6~52个。卵泡发育数和回收卵数不受eCG剂量或季节(7和1月)的影响。从468个卵泡中收集到456个卵母细胞,回收率为97.4%,平均每头回收(28.5±3.4)个卵。456个卵中,378个(82.9%)是成熟的,48个(10.5%)未成熟,30个(6.6%)退化。而且从10头雄虎中经电刺激取得(7.5±0.7)mL的精液量,结构正常的精子数为81.4%。IVF率为63.4%(227/358),卵裂率为95.9%。对照组中无孤雌卵裂现象。将86个质量好的2~4细胞胚胎移植到6头受体中,有1头妊娠,生下3只虎崽。有46枚胚胎体外培养96 h后,43.5%发育到桑葚胚,30.4%发育到早期囊胚。虎卵母细胞的IVM、IVF和ET是可行的。这个实验说明,用于家猫的IVM/IVF方案完全适合于虎的操作。虎易受eCG/hCG刺激,可产生大量的发育卵泡,其中大部分卵是成熟的,可以进行IVF,而且IVF胚胎在体内、体外均能正常发育。虎胚胎在体外较易发育到桑葚胚,然而也似乎存在部分发育阻断(桑葚胚-囊胚);但更为重要的是这些胚胎发育正常,移植后能生产幼虎。

猫科动物的IVF率从0~80%不同。除了技术操作问题之外,最关键的应是配子质量问题。有些种类,如美洲狮(*Puma concolor*)和猎豹(*Acinonyx jubatus*)的IVF率很低,原因是精子质量差,并与精子多态(sperm pleiomorphisms)高发症有关(Pope,2000)。利用冷藏或冷冻精子,分别可使非洲野猪、狞獾、云豹、食肉猫(fishing cat)的IVF率达到50%~80%以上。ICSI技术也曾应用于美洲虎(*Herpailurus yaguarondi*)的体外受精。1只美洲虎经FSH和hCG超排后,获得18枚良好的卵母细胞;经ICSI后,得到10个胚胎。将这些胚胎移植到受体家猫后,未能获得仔虎(Pope *et al*.,1998)。

以家猫为受体,移植4枚印第安沙漠猫(Indian desert cat)的桑葚胚和10枚家猫的桑葚胚后,有1只家猫产下2只印第安沙漠猫(Pope *et al*.,1993)。将IVF得到的虎胚胎移植到6头受体虎后,其中1头生下3只小虎(Donoghue *et al*.,1990)。将8枚非洲野猫的IVF桑葚胚移植到1只家猫受体后,获得3只非洲野猫(Pope,2000)。

在整个北美,各相关动物研究和保护机构已建立起合作网,其目的是从突然死亡或作卵巢切除手术的动物获得卵巢进行研究。已收集了猫科动物虎、狮、豹、美洲虎、雪豹、美洲狮、猎豹、云豹等11种35只动物的卵巢。大多数动物的卵巢卵母细胞可以完成体外成熟。体外受精后,可以受精并卵裂。结果还表明:①从猫科动物收集卵巢是可能的,甚至其卵巢在生理盐水中保存36 h后再收集卵母细胞仍可成熟至MⅡ期;②年轻或中年健康的动物,卵的质量、IVM/IVF率可与家猫的相比(Johnston *et al*., 1991c)。尽管这一研究中的动物有一半体质较差,但仍有66.7%的可收集到卵,IVM率仍达48.9%。同样地,从老年雌性动物中也可以收集到质量不错的卵母细胞。

我们实验室开展了猫的超排及其卵巢卵母细胞

体外培养等工作，目的是为进行猫和大熊猫异种克隆作前期的准备工作。

参 考 文 献

Adams C E, 1982. Mammalian Egg Transfer [M]. Florida: CRC Press, Inc. Boca Raton. 50 – 58.

Barone M A, Wildt D E, Byers A P *et al*, 1994. Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*) [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **101**: 103 – 108.

Batten B A, Roh S I, Kim M H, 1989. Effect of progesterone and a progesterone antagonist (RU486) on germinal vesicle breakdown in the mouse [J]. *Ana. Rec.*, **223**: 387 – 392.

Byers A P, Donoghue A M, Roth T L *et al*, 1994. Oocyte nuclear maturation at the time of oocyte aspiration is independent of *in vitro* fertilization potential in the domestic cat [J]. *J. Exp. Zool.*, **270**: 399 – 404.

Camous S, Heyman Y, Meziou W *et al*, 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **72**: 479 – 485.

Chang M C, 1969. Development of transferred ferret eggs in relation to the age of corpora luteal [J]. *J. Exp. Zool.*, **171**: 459.

Donoghue A M, Johnston L A, Seal U S *et al*, 1990. *In vitro* fertilization and embryo development *in vitro* and *in vivo* in the tiger (*Panthera tigris*) [J]. *Biol. Reprod.*, **43**: 733 – 744.

Donoghue A M, Johnston L A, Munson L *et al*, 1992. Influence of gonadotropin treatment interval on follicula maturation *in vitro* fertilization, circulating steroid concentrations, and subsequent luteal function in the domestic cat [J]. *Biol. reprod.*, **46**: 972 – 980.

Donoghue A M, Johnson L A, Armstrong D L *et al*, 1993. Birth of a Siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination [J]. *J. Zool. Wildl. Med.*, **24**: 185 – 189.

Dziuk P, 1985. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival [J]. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **33**: 57 – 63.

Edgar D E, Whalley K M, Mills J A, 1987. Preimplantation development following *in vitro* fertilization of mouse oocytes: effects of timing of superovulation and preincubation *in vitro* [J]. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.*, **2**: 111 – 115.

Eyestone W H, First N L, 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **85**: 715 – 720.

Gandolfi F, Moor R M, 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **81**: 23 – 28.

Goodrowe K L, Wildt D E, 1987. Ovarian response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin releasing hormone in cats in natural or induced estrus [J]. *Theriogenology*, **27**: 811 – 817.

Goodrowe K L, Wall R J, O'Brien S J *et al*, 1988. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization *in vitro* [J]. *Biol. Reprod.*, **39**: 355 – 372.

Hillier S G, Siddiquey A K S, Winston R M L, 1985. Fertilization *in vitro* of cumulus-enclosed mouse oocytes: effect of timing of the ovulatory hCG injection [J]. *Int. J. Fertil.*, **30**: 34 – 38.

Hoffert K A, Anderson G B, Wildt D E *et al*, 1997. Transition from maternal to embryonic control of development in IVM/IVF domestic cat embryos [J]. *Mole. Reprod. Dev.*, **48**: 208 – 215.

Howard J G, Barone M A, Donoghue A M *et al*, 1992. The effect of preovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **96**: 175 – 186.

Howard J G, Barone M, Byers A *et al*, 1993. Ovulation induction sensitivity and laparoscopic intrauterine insemination in the cheetah, puma and clouded leopard [J]. *J. Androl.*, (suppl. 1): 55 (abstract).

Howard J G, Byers A P, Brown J L *et al*, 1996a. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) [J]. *Zoo. Biol.*, **15**: 55 – 70.

Howard J G, Donoghue A M, Barone M A *et al*, 1996b. Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*) [J]. *J. Zool. Wildl. Med.*, **23**: 288 – 300.

Johnston L A, O'Brien S J, Wildt D E *et al*, 1989. *In vitro* maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes [J]. *Gamete Res.*, **24**: 343 – 356.

Johnston L A, Donoghue A M, O'Brien S J *et al*, 1991a. Culture medium and protein supplementation influence *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat [J]. *J. Exp. Zool.*, **257**: 350 – 359.

Johnston L A, Donoghue A M, O'Brien S J *et al*, 1991b. Influence of temperature and gas atmosphere on *in vitro* fertilization and embryo development in the domestic cat [J]. *J. Reprod. Fert.*, **92**: 377 – 382.

Johnston L A, Donoghue A M, O'Brien S J *et al*, 1991c. "Rescue" and maturation *in vitro* of follicular oocytes of nondomestic felid species [J]. *Biol. Reprod.*, **45**: 898 – 906.

Kanda M, Miyazaki T, Kanda M *et al*, 1998. Development of *in vitro* fertilized feline embryos in a modified Earle's balanced salt solution: influence of protein supplements and culture dishes on fertilization success and blastocyst formation [J]. *J. Vet. Med. Sci.*, **60** (4): 423 – 431.

Kraemer D C, Flow B L, Schriver M D *et al*, 1994. Embryo transfer in the non human primate, feline, and canine [J]. *Theriogenology*, **11**: 51.

Leibfried-Rutledge M L, Critser E S, Eyestone W H *et al*, 1987. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo* [J]. *Biol. Reprod.*, **36**: 376 – 383.

Levran D A, Lopata P L, Nayuda M J *et al*, 1985. Analysis of the outcome of *in vitro* fertilization in relation to the timing of human chorionic gonadotropin administration by the duration of estradiol rise in stimulated cycles [J]. *Fertil. Steril.*, **44**: 335 – 341.

Li G P, Lian L, Chen D Y *et al*, 2001. Superovulation and *in vitro* maturation of cat oocyte. (submit) [李光鹏、廉 莉，陈大元等，2001. 猫的超数排卵及卵母细胞的体外成熟.（已投出）]

Lu L S, Sui S X, Wang X M *et al*, 1990. Study of cat superovulation [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, **21** (3): 203 – 207. [吕连升，隋顺霞，王新明等，1990. 家猫超数排卵的研究. 畜牧兽医学报. 21 (3): 203 ~ 207.]

Mizoguchi H, Dukelow W R, 1980. Effect of timing of hCG injection on fertilization in supeovulated hamsters [J]. *Biol. Reprod.*, **23**: 237 – 241.

Niwa K, Ohara K, Hosoi Y *et al*, 1985. Early events of *in-vitro* fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **74** (2): 657 – 660.

Phillips L G, Simmons L G, Bush M *et al*, 1982. Gonadotropin regimen for inducing ovarian activity in captive wild felids [J]. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **181**: 1246 – 1250.

Pope C E, 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids [J]. *Theriogenology*, **53**: 163 – 174.

Pope C E, Gelwicks E J, Wachs K B *et al*, 1989. Successful interspecies transfer of embryos from the Indian desert cat (*Felis silverstris ornata*) to the domestic cat (*Felis catus*) following *in vitro* fertilization [J]. *Biol. Reprod.*, **40** (suppl. 1): 61 (abstract 40).

Pope C E, Keller G L, Dresser B L, 1993. *In vitro* fertilization in domestic

and non-domestic cats including sequences of early nuclear events, development in vitro, cryopresation and successful intra- and interspecies embryo transfer[J]. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **47**: 189-201.

Pope C E, McRae M A, Plair B L *et al*, 1997. *In vitro* and *in vivo* development of embryos produced by *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of cat oocytes[J]. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **51**: 69-82.

Pope C E, Johnson C A, McRae M A *et al*, 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes[J]. *Anim. Reprod. Sci.*, **53**: 221-236.

Robinson J J, Wallace J M, Aitken R P, 1989. Fertilization and ovum recovery rates in superovulates ewes following cervical insemination or laparoscopic intrauterine insemination at different times after progestogen withdrawal and in one or both uterine horns[J]. *J. Reprod. Fertil.*, **87**: 771-782.

Roth T L, Swanson W F, Wildt D E, 1994. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized *in vivo* versus *in vitro*[J]. *Biol. Reprod.*, **51**: 441-451.

Roth T L, Wolfe B A, Long J A *et al*, 1997. Effects of equine chorionic gonadotropin, human chorionic gonadophin, and laparoscopic artificial insemination on embryo, endocrine, and luteal characteristics in the domestic cat[J]. *Biol. Reprod.*, **57**: 165-171.

Salustri A, Petrungaro S, DeFelici M *et al*, 1995. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured *in vitro*[J]. *Biol. Reprod.*, **33**: 797-802.

Schramm R D, Bavister B D, 1995. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured *in vitro*[J]. *Reprod. Fertil. Dev.*, **7**: 1061-1066.

Schroeder A C, Eppig J, 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously is normal[J]. *Develop Biol.*, **102**: 493-497.

Sengoku K, Dukelow W R, 1988. Gonadotropin effects on chromosomal normality of hamster preimplantation embryos[J]. *Biol. Reprod.*, **38**: 150-155

Shimizu T, Tsutsui T, Murao I *et al*, 1990. Incidence of transuterine migration of embryos in the dog[J]. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **52**: 1273-1275.

Swanson W F, Roth T L, Wildt D E, 1994. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortally in the domestic cat[J]. *Biol. Reprod.*, **51**: 452-464.

Swanson W F, Horohov D W, Godke R A, 1995. Production of exogenous gonadotro phin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids[J]. *J. Reprod. Fertil.*, **105**: 35-41.

Templeton A A, Vanlook P, Angell R E *et al*, 1986. Oocyte recovery and fertilization rates in women at various times after the administration on hCG[J]. *J. Reprod. Fertil.*, **76**: 771-778.

Vanderhden B C, Armstrong D T. 1989. Role of cumulus cells and serum on *in vitro* maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes[J]. *Biol. Reprod.*, **40**: 720-728.

Vanderhden B C, Rouleau A, Armstrong D T, 1986. Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes[J]. *J. Reprod. Fertil.*, **77**: 393-399.

Wildt D E, Kinney G M, Seager S W J, 1978. Gonadotropin-induced reproductive cyclicity in the domestic cat[J]. *Lab. Animal Sci.*, **28**: 301-307.

Wildt D E, Bush M, Howard J G *et al*, 1983. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat[J]. *Biol. Reprod.*, **29**: 1019-1025.

Wildt D E, Schiewe M C, Schmidt P M *et al*, 1986 Developing animal model systems for embryo technologies in rare and endangered wildlife[J]. *Theriogenology*, **25**: 33-51.

Williams R F, Hodgen G D, 1980. Disparate effects of human chorionic gonadotropin during the late follicular phase in monkeys: normal ovulation, follicular atresia, ovarian cyclicity and hypersecretion of follicle-stimulating hormone[J]. *Fertil. Steril.*, **22**: 64-68.

Wolfe B A, Woldt D E, 1996. Development to blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized *in vitro* after prolonged cold storage[J] *J. Reprod. Fertil.*, **106**: 135-141.

Wood T C, Byers A P, Jennette B E *et al*, 1995. Influence of protein and hormone supplementation on *in vitro* maturation and fertilization of domestic cat eggs[J]. *J. Reprod. Fertil.*, **104**: 315-323.

Yan Y Q, Li G P, Zheng X M, 1995. Theory of Developmental Biology and Embryo Engineering[M]. Heilongjiang: Heilongjiang Science & Technique Press. [严云勤, 李光鹏, 郑小民, 1995. 发育生物学原理与胚胎工程. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社.]

Reproduction Engineering of Domestic Cat and Nondomestic Felid Species

LI Guang-Peng LIAN Li LIAN Ying CHEN Da-Yuan

(*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

Abstract: Among the vertebrates, felid species are some special animals, including 37 species, which are all rare or endangered species except domestic cat. Therefore, it is very important to study domestic cat's reproductive habits and regularities, especially its reproductive engineering, such as *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and inrtocytoplasmic sperm injection (ICSI) of cat's ovarian oocytes, etc. These mordern reproductive technique will provide a powerful promotion in the reproduction and protection of the nondomestic felid species.

Key words: Reproductive engineering; *In vitro* maturation; *In vitro* fertilization; Introcytoplasmic sperm injection